

Kit pour électrophorèse d'ADN d'abeilles

Réf. ELECTAB

A RECEPTION DU COLIS :

- Vérifier la composition** du colis indiquée ci-dessous
- ⚠ Stocker les articles du colis dans les bonnes conditions :
 - ⚠ Placer le sachet AG à **-20°C** ⚠
 - ⚠ Placer le reste à **température ambiante** ⚠

Attention : Ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une conservation des produits du kit de 3 mois.

- Avant toute manipulation**, étudier les conseils de **sécurité**

COMPOSITION

- Un sachet AG contenant :
 - o Un tube de marqueur de poids moléculaire à bouchon rouge
 - o Un tube d'ADN de référence Q à bouchon marron
 - o Un tube d'ADN de référence PQ à bouchon noir
 - o 2 tubes d'ADN à identifier à bouchon rose (ADN1) et orange (ADN2)
- Un sachet d'agarose
- Un flacon d'Azur A
- 100 ml de tampon TBE prêt à l'emploi

MATERIEL NECESSAIRE

- Micropipettes et cônes
- Ethanol absolu
- Eau distillée
- Cuve à électrophorèse d'ADN avec moule à gel et peigne à gel 6 puits
- Alimentation pour cuve à électrophorèse
- Flacons d'un litre
- Gant anti-chaleur ou moufle de préhension
- Micro-onde ou bain-marie
- Gants type latex

OBJECTIFS COGNITIFS

Ce kit propose de réaliser une électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose afin de génotyper des espèces d'abeilles récoltées en France à partir de leur ADN mitochondrial ; amplifié sur une séquence spécifique par la technique la PCR.

Pourquoi génotyper les abeilles grâce à la technique de PCR ?

L'effondrement des colonies d'abeilles est un problème majeur qui touche tous les continents. Cet effondrement peut-être lié à plusieurs facteurs tels que l'utilisation massive des pesticides, les monocultures, le développement de parasites comme le varroa, les espèces invasives ...

Une pratique apicole peu évoquée est l'hybridation ; croisement entre plusieurs sous-espèces d'abeilles. L'hybridation pourrait aussi être un facteur de fragilisation des colonies car il introduit des espèces non endémiques qui vont entrer en compétition avec les espèces locales (endémiques) pour la conquête de l'espace. De plus, n'étant pas adaptées à leur nouvel écosystème, ni lui à elles, ces espèces exogènes perturbent cet écosystème et par conséquent les espèces locales qui y étaient adaptées. Il s'agit donc pour les apiculteurs de déterminer le taux d'hybridation de leur(s) rucher(s) afin d'identifier l'ensemble des causes potentielles d'une décimation de colonies.



L'abeille est un hyménoptère, appartenant au genre *Apis*, qui comporte plusieurs espèces sociales.

L'*Apis mellifera* se rencontre en Europe, en Afrique, au Proche-Orient, et dans une partie de la Sibérie. Sa très grande extension géographique et les conditions climatiques différentes ont produit des lignées aux caractères morphologiques et comportementaux variés.

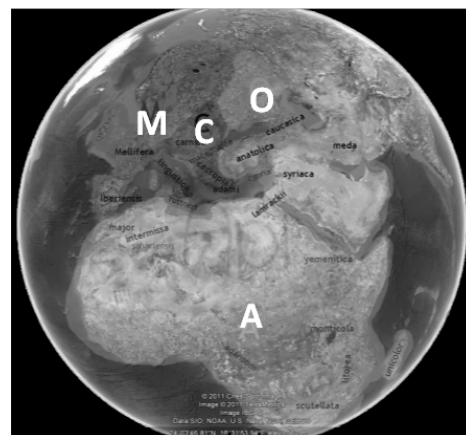
Il existe 4 lignées évolutives de l'espèce *Apis mellifera* sur leur aire de répartition naturelle :

- la lignée M (ouest-méditerranéennes = abeille noire)
- la lignée A (africaines)
- la lignée C (nord-méditerranéennes)
- la lignée O (Turquie et Caucase)



Lorsque l'on s'intéresse aux aires de répartitions de ces 4 lignées, on s'aperçoit qu'elles sont vastes et peuvent notamment s'expliquer par la cartographie des périodes de glaciations. Par exemple, la divergence entre les lignées M et C-O s'explique par la présence d'une calotte glaciaire qui longeait leurs lignes de démarcations. Le réchauffement climatique et la fonte de ces calottes glaciaires a ensuite conduit au «métissage» des lignées (NB : toutes peuvent se reproduire entre elles).

Aujourd'hui, le métissage est essentiellement dû à la pratique de plus en plus rependue de l'hybridation. Un des pionniers de l'hybridation contrôlée chez les abeilles était le frère Adam qui vivait en Angleterre dans l'abbaye de Buckfast. Il développa ce principe d'hybridation car il pensait pouvoir obtenir «l'abeille idéale». A l'époque il s'agissait d'améliorer la race locale décimée par la maladie de l'île Wight (causée par *Acaparis woodi* une «mite trachéale»). De nos jours, les apiculteurs poursuivent ses méthodes afin de trouver une abeille excellente butineuse, propre, peu agressive et aussi peu essaimeuse (c'est-à-dire qui ne forme pas de ruche/colonie ailleurs qu'au lieu où elle a été implantée). La buckfast (connue dans le monde entier) est donc le résultat d'une hybridation considérée comme réussie par de nombreux professionnels ; croisement de plusieurs races résistantes importées de diverses régions du monde (saharienne, ligustica, mellifera). Ses qualités et ses performances continuent de s'améliorer grâce à une sélection continue (pour cumuler les qualités et écarter les défauts) car il est difficile de stabiliser les caractères de l'abeille sur plusieurs générations.



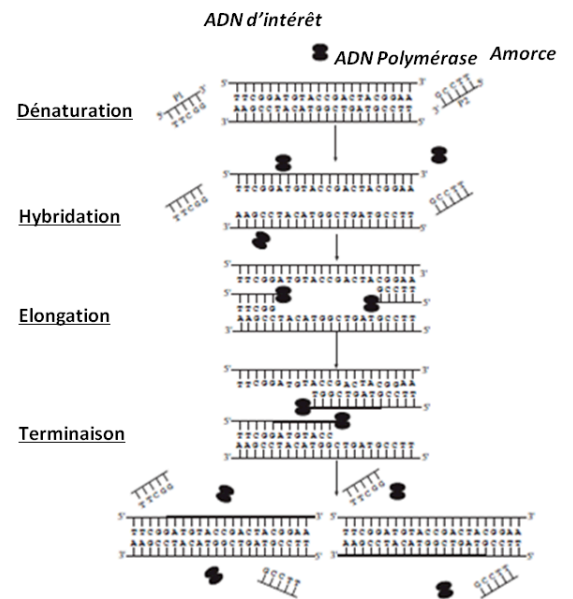
C'est pourquoi il est important de pouvoir identifier sur des caractères physiques et/ou génétiques l'état d'hybridation d'une colonie. La PCR est un des moyens rapides d'identifier un individu sur des caractéristiques génétiques.

Des élèves du Lycée Marie Laurencin à Mennecy ont réalisé, lors d'un TPE en 2013, une étude d'évaluation du taux d'hybridation de plusieurs ruchers, dont le leur, afin d'étayer l'argument actuellement controversé selon lequel l'hybridation pourrait aussi être un facteur de fragilisation des colonies d'abeilles. Nous les remercions pour leur contribution à l'élaboration de ce kit.

La réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain

La réaction en chaîne par polymérase est utilisée pour obtenir une quantité importante de copies d'un fragment d'ADN défini, à partir d'une quantité infime de celui-ci.

La réaction de PCR consiste en une réplique d'ADN in vitro. ci est possible grâce à l'ajout d'une enzyme de réplique ; l'ADN polymérase, des quatre desoxyribonucléotides triphosphates nécessaire à la synthèse de molécule d'ADN (adénine, cytosine, guanine, thymine), et d'amorces de réplique consistant en de courtes séquences d'ADN simple spécifiques de l'ADN d'intérêt. En effet, les amorces sont synthétisées artificiellement de façon à avoir une séquence strictement complémentaire aux extrémités de l'ADN d'intérêt. réaction de PCR, on ajout un couple d'amorces constitué d'une complémentaire à la région 3' de l'ADN d'intérêt et d'une complémentaire à sa région 5'. La séquence desoxyribonucléotidique du segment d'ADN d'intérêt doit donc



Le processus de PCR fonctionne selon quatre étapes :

Le mélange est d'abord chauffé à une température proche de 100°C afin de dénaturer les molécules d'ADN. En effet, les molécules d'ADN d'intérêt sont des doubles brins qui doivent être séparés préalablement à la réplique. De plus, la dénaturation assure aussi que l'ADN d'intérêt et les amorces soient dans une configuration linéaire pour faciliter l'étape d'hybridation qui suit.

Le mélange est ensuite refroidi vers une température de 45 à 60°C selon les couples d'amorces pour permettre leur appariement avec l'ADN d'intérêt ; c'est l'hybridation.

L'ADN polymérase va alors ajouter les desoxyribonucléotides à l'extrémité 3' de chaque amorce en utilisant le brin d'ADN d'intérêt comme matrice de réplique ; c'est l'élongation. Cette étape s'effectue à 72°C ; la température optimum de fonctionnement de l'enzyme de réplique ADN polymérase. De cette manière, un nouveau brin complémentaire est formé et on obtient ainsi deux molécules d'ADN double brin identique à l'ADN d'intérêt.

Le cycle formé par ces 3 premières étapes est répété entre 30 et 50 fois. A chaque cycle, le nombre de molécule d'ADN est doublé.

La dernière étape consiste en la terminaison des molécules d'ADN nouvellement synthétisées. Cette étape s'effectue aussi à 72°C et assure que les molécules d'ADN nouvellement synthétisées soient entières et correspondent strictement à la molécule d'ADN d'intérêt.

MANIPULATION

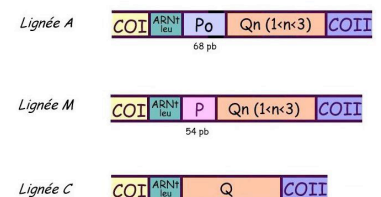
Les échantillons d'ADN fournis correspondent à :

- 2 échantillons de référence obtenus lors d'une vraie expérience de PCR réalisées à partir d'ADN mitochondrial d'abeilles Méditerranéennes et Africaines.
- 2 échantillons obtenus lors d'une vraie expérience de PCR réalisées à partir d'ADN mitochondrial d'abeilles récoltées en France, et à identifier par comparaison aux échantillons de référence.

L'ADN mitochondrial de l'abeille est caractérisé par des régions intergéniques dont la longueur varie d'une race à une autre. Dans ces régions, il existe des sous-unités P (54 pb) et des sous-unités Q (192-196 pb). Ces sous-unités peuvent se combiner selon différentes séquences de répétitions : P, PQ, PQQ ...

- o Les sous unités P suivies d'un ou plusieurs Q correspondent à lignée M
- o Les sous unités Po suivies d'un ou plusieurs Q correspondent à la lignée A
- o La présence d'un unique Q correspond à la lignée C.

Les échantillons d'ADN fournis ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spéciales ciblant les régions P et Q.



PREPARATION du TP :

Ce protocole s'adapte à l'utilisation des cuves d'électrophorèse et alimentations Sordalab. Pour tout autre matériel, ajuster les quantités de gel d'agarose à préparer et le procédé de mise en œuvre de l'électrophorèse aux recommandations du constructeur.

a. Préparation des 5 gels d'agarose 0,8% :

- Mélanger les 2g d'agarose avec 250ml de TBE préparé précédemment.
- Faire chauffer pendant 2-3 minutes au micro-onde jusqu'à ce que la solution soit complètement homogène et transparente (ne pas couvrir la solution).
- Utiliser des gants anti-chaleur ou des maniques de préhension pour saisir et manipuler le flacon chaud.
- Laisser refroidir jusqu'à une température d'environ 60°C.
- Fermer hermétiquement les 5 moules à gel aux extrémités avec les butoirs en caoutchouc ou avec du ruban adhésif et placer le peigne 8 puits.
- A l'aide de gants anti-chaleur ou de moufle de préhension, couler l'agarose dans les moules jusqu'à une hauteur correspondant environ à la moitié de la hauteur des dents du peigne.
- Laisser durcir à température ambiante sur une surface plane et horizontale (le gel doit devenir trouble). Ce gel se conserve une heure à sec ou 2 à 3 jours au réfrigérateur dans du TBE.

b. Préparation des échantillons contenus dans le sachet AG :

Les tubes sont prêts à l'emploi.

- Centrifuger rapidement les tubes afin de faire retomber tout le liquide dans le fond du tube. Si vous ne possédez pas de centrifugeuse, secouer **d'un seul mouvement sec**, de haut en bas, les tubes un à un.

MANIPULATION PAR LES ELEVES :

Mise en œuvre de l'électrophorèse :

- Enlever délicatement les butoirs et le peigne.
- Placer le moule à gel contenant le gel dans la cuve à électrophorèse. Prendre garde de positionner les puits du côté des bornes négatives de la cuve à électrophorèse.
- Verser le tampon TBE dans la cuve jusqu'à recouvrir le gel (attention : plus il y a de tampon, plus la migration prend de temps).

1. Dépôt et migration des ADN :

- Déposer 15µl de chaque ADN à l'aide d'une micropipette et de cônes à usage unique dans des puits distincts. Faire doucement et éviter les bulles (attention à bien noter l'ordre des dépôts).
- Fermer la cuve à électrophorèse et la brancher sur l'alimentation (cathode noire avec cathode noire et anode rouge avec anode rouge).
- Mettre en marche l'alimentation (Attention au voltage choisi : pour l'ADN, choisir 75V). L'ADN, chargé négativement, migre en direction de l'anode ; électrode positive.

ATTENTION : Si les puits n'ont pas été disposés du côté de la cathode ; électrode négative, l'ADN va migrer hors du gel.

- Lorsque la bande bleue a migré jusqu'à 1cm de l'extrémité opposée du gel, arrêter l'alimentation et sortir le support contenant le gel.

2. Coloration et rinçage :

- Verser l'Azur A dans un récipient juste assez large pour y disposer le gel à plat (type cristalliseur de 500ml). Solution prête à l'emploi, après ouverture, conserver à +4°C.
- Sortir le gel de son moule.
- Immerger le gel dans de l'Azur A pendant 5 minutes (le colorant peut être réutilisé).
- Laisser reposer le gel à l'air pendant 5 à 10 minutes.
- Placer le gel dans un nouveau récipient.
- Rincer le gel à l'eau du robinet.

Si le gel est très foncé

- Rincer le gel avec de l'alcool à 70% pendant quelques minutes.
- Eliminer l'alcool en rinçant le gel à l'eau du robinet plusieurs fois jusqu'à ce que l'eau de rinçage soit translucide.
- Continuer le rinçage du gel à l'eau du robinet si nécessaire.

L'APPARITION DE LA TOTALITE DES BANDES PEUT DEMANDER PLUSIEURS MINUTES

Le gel peut se conserver au réfrigérateur pendant deux mois emballé dans un film alimentaire ou dans un récipient en plastique hermétiquement fermé et contenant un fond d'eau (**attention** le gel doit rester juste humidifié, un excès d'eau entraînerait une poursuite de la décoloration).

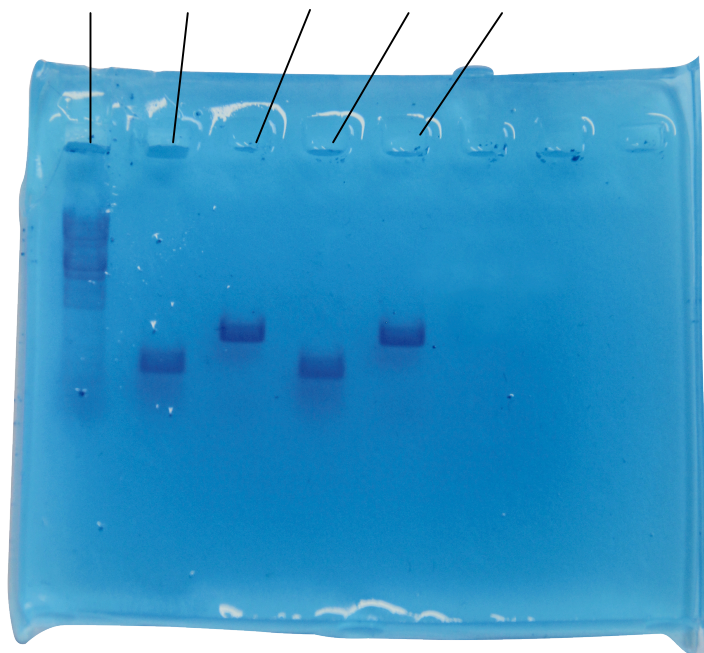
RESULTATS ATTENDUS ET INTERPRETATION

La hauteur de migration des bandes d'ADN correspond à la taille des fragments d'ADN contenu dans chaque échantillon. Cette taille peut être quantifiée grâce à l'échelle de poids moléculaire contenant des fragments de taille connue. En effet, un fragment d'une taille donnée migre toujours à la même vitesse et plus le fragment est court, plus il migre vite à travers les mailles du gel d'agarose.

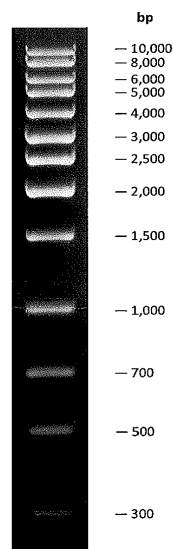
Ainsi, les bandes hautes correspondent à des ADN de grande taille qui ont migrés lentement, telles que les séquences PQ. Les bandes plus basses correspondent à des ADN de plus petite taille qui ont migrés plus rapidement, telles que les séquences Q.

Voici un exemple de résultats obtenus avec ce kit :

Marqueur ; ADN Q ; ADN PQ ; ADN n°1 ; ADN n°2



Marqueur de poids moléculaire



Suite à la migration sur gel, on peut identifier les ADN comme suit :

- ADN n°1 : Q
- ADN n°2 : PQ

FICHE SECURITE (guide non exhaustif)

- Ne pas inhaler ni ingérer les produits contenus dans ce kit. Eviter les projections dans les yeux. En cas de projection dans les yeux, rincer à grande eau. Cependant, aucun des produits contenus dans ce kit ne requièrent de précaution particulière.
- Le gel d'agarose chaud peut provoquer des brûlures. Manipuler avec des gants anti-chaleur. **En cas de brûlures, passer la zone atteinte sous l'eau froide pendant 15 minutes.**
- Nous vous conseillons de manipuler les colorants avec des gants.

FICHE CONSERVATION

Attention: ces conditions de stockage sont à respecter scrupuleusement pour permettre une conservation des produits du kit pendant 3 mois.

Les échantillons d'ADN sont stockés à -20°C pendant 3 mois.

Cependant, après un stockage prolongé, l'eau peut s'évaporer du tube. Bien que cela n'endommage pas l'ADN, cela diminue le volume de la solution et augmente sa viscosité. Dans ce cas, rajouter de l'eau stérile et mélanger doucement jusqu'à obtenir une solution homogène à nouveau.

Le tampon TBE se conserve pendant 3 mois à +4°C.

Le colorant Azur A se conserve pendant 6 mois à +4°C et à l'abri de la lumière. Ce colorant peut être utilisé pour plusieurs colorations.

L'agarose en poudre se conserve indéfiniment à température ambiante dans un endroit sec. L'agarose en gel se conserve environ un mois à +4°C dans un récipient hermétiquement fermé, type bouteille. Veillez à ajouter un peu d'eau par-dessus le gel de façon à ce qu'il reste toujours humide.

L'eau stérile se conserve à +4°C jusqu'à ouverture du tube.

FICHE TRI ET RECUPERATION

Les ADN, l'Azur A et le TBE peuvent être jetés à l'évier en faisant couler de l'eau.

Les tubes de plastiques, après rinçage, peuvent être jetés dans les bacs de récupération du plastique (sans leur bouchon).

L'agarose peut être jeté à la poubelle.